

## 紫苏 DNA 导入对烟叶中芦丁含量的影响\*

魏克强<sup>1</sup>, 杨俊仙<sup>2,3</sup>, 魏治中<sup>3</sup>

- (1. 山西大学生命科学学院, 山西 太原 030006;
2. 山西大学经济与工商管理学院, 山西 太原 030006;
3. 山西农业大学农学院, 山西 太谷 030801)

**摘要:** 以药用植物紫苏为供体, 普通烟草品种 78-04 为受体, 研究了紫苏 DNA 导入对烟叶中芦丁含量的影响。采用无性嫁接与有性杂交相结合的方法, 在适宜的授粉环境下将紫苏 DNA 导入普通烟草中; 采用高效液相色谱法检测烟叶中芦丁的含量。结果显示, 在低温 (22~25 ℃)、高相对湿度 (70%~80%) 的环境下, 该方法可以显著提高外源 DNA 导入烟草的成功率。烟叶中芦丁含量的检测表明, 导入后代比受体普通烟草品种 78-04 提高了 70.4%, 并且比我国主要产区槐米的芦丁含量高 4~5 倍。紫苏 DNA 导入普通烟草为大量提取芦丁提供了新的原料, 也为开发利用药用植物基因资源探索出了一条新的途径。

**关键词:** 紫苏; 烟叶; 芦丁

**中图分类号:** S572 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2011) 03-0102-04

### Effect of Introducing *Perilla frutescens* (L.) Britt DNA on Rutin Content in Tobacco Leaves

WEI Keqiang<sup>1</sup>, YANG Junxian<sup>2,3</sup>, WEI Zhizhong<sup>3</sup>

- (1. School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China ;
2. School of Economics and Business Administration, Shanxi University, Taiyuan 030006, China ;
3. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

**Abstract:** This paper studied the content of rutin in the progenies of flue-cured tobacco with introduced exogenous DNA of *Perilla frutescens* (L.) Britt. The method of sexual hybridization combined with asexual graft was used to introduce exogenous DNA into tobacco, and the optimum environment of pollination was selected. HPLC was adopted to analyze the content of rutin in tobacco leaves. This method could significantly improve the success ratio of introducing exogenous DNA under the condition of lower temperature (22~25 ℃) and higher relative humidity (70%~80%). The results of the analysis showed that the content of rutin in the progenies increased by 70.4% compared with that in female parent tobacco leaves and was 4~5 times higher than that in buds of *Sophora japonica* L. from main production area in China. The progenies of flue-cured tobacco with introduced exogenous DNA could provide new materials for mass-extraction of rutin. This study also explored a new way for utilizing gene resources in medicinal plants.

**Key words:** *Perilla frutescens* (L.) Britt; tobacco; rutin

芦丁 (Rutin), 又名芸香苷 (Rutinoside), 是重要的黄酮类多酚生物活性物质, 具有抗炎、抗氧

\* 收稿日期: 2010-08-18

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (200801081012); 国家烟草专卖局重点科技资助项目 (110199901005); 山西省科技产业化环境建设计划资助项目 (2006071033)

作者简介: 魏克强 (1970年生), 男, 博士, 副教授; E-mail: kqwei@sxu.edu.cn; kqwei88@sohu.com。

化、抗病毒、降低毛细血管通透性等作用,被广泛用于医药、保健食品和化妆品中,开发利用价值很高。在自然界中芦丁的含量十分丰富,尤以芸香科植物芸香草 *Cymbopogon distans* (Needs) W. wats、豆科植物国槐 *Sophora japonica* L.、蓼科植物荞麦 *Fagopyrum esculentum* Moench、金丝桃科植物红旱莲 *Hypericum ascyron* L. 等含量较高。目前,我国芦丁的生产主要以槐米(槐花的花蕾)为原料进行提取<sup>[1]</sup>。

烟草中存在多种酚类物质,特别是烤烟中含有较高的芦丁和绿原酸,其含量可占总酚量的 75%~95%<sup>[2]</sup>,在烟草的生长发育、调制特性、烟叶色泽、烟气香味和烟气生理强度等方面起着重要作用,而且与烟草制品的等级呈正相关,多酚类物质含量高的卷烟等级越高<sup>[3]</sup>。我国是烟草种植和生产大国,其种植面积和产量均居世界首位。但是,在烟草种植和加工过程中,产生的废次烟叶约占烟叶总产量的 30%左右,绝大部分作为废物被丢弃,造成了严重的资源浪费和环境污染。不同类型烟草中多酚类物质的含量存在较大的差异,烤烟中含量最高,可达 7%,晾晒烟中的含量仅占 0.5%左右<sup>[3]</sup>。本研究将药用植物紫苏 DNA 导入普通烟草中,探讨其对烟叶中芦丁含量的影响,对改善烟草制品的品质具有重要意义,并为大量提取芦丁提供新的原料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供体为药用植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt,种子由中国医学科学院药用植物研究所提供;受体为普通烟草 *Nicotiana tabacum* L. 品种 78-04(为山西农业大学培育的烤烟品系),以及被选育出的杂种后代稳定品系(命名为紫苏烟, Zisu tobacco)、野生种林烟草 *N. sylvestris*,种子均由山西农业大学烟草育种研究室提供。

### 1.2 试验仪器

Dionex Summit 高效液相色谱系统(美国 Dionex),170U 可见-紫外检测器。

### 1.3 试验方法

1.3.1 紫苏 DNA 导入烟草的方法 试验在山西农业大学农学院温室进行。采取先嫁接再有性杂交的方法,并选择适宜的授粉环境。取一株野生种林烟草烟苗,于地面以上 8~10 cm 处切断,再从横截面中心向下顺直劈切接口作为砧木;另切取做受体的普通烟草 78-04 烟苗幼茎为接穗,使砧、穗紧

密结合后,立即用塑料薄膜绑紧接口处以利保湿,使之愈合成为一株独立的烟苗(图 1)。将嫁接的烟苗遮荫以避免阳光直射,浇足水并加强管理。在开花期的早晨或傍晚采集供体紫苏的花粉,授于去了雄蕊的接穗烟草 78-04 的柱头上,然后套袋。紫苏 DNA 导入烟草的效果以单株结果数、蒴果种子粒数、千粒质量等指标综合评定。

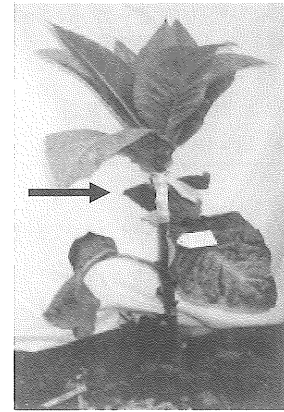


图 1 嫁接后生长的烟草植株(箭头所示为嫁接处)

Fig. 1 The growing tobacco plant after graft

(The arrow indicated the place of graft)

1.3.2 烟叶中芦丁含量的测定 试验材料栽培于山西农业大学农学院试验田,待烟草成熟采收烘烤后,依据 GB2635-92(烤烟)的分级方法,取中部叶 C3F 0.5 kg,由吉林大学基础医学院采用高效液相色谱法检测烟叶中的芦丁含量<sup>[2]</sup>。另取 78-04 烟叶及开花期的紫苏叶作为对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 无性嫁接与有性杂交相结合对紫苏 DNA 导入烟草的影响

本研究由于选择了适宜的砧木(林烟草),嫁接的烟苗对环境具有较强的适应性,同时做接穗的烟苗(78-04)与砧木并非有性杂交,其遗传性状比较稳定。通过嫁接利用砧木影响接穗的营养代谢条件,促进雌蕊接受花粉的代谢作用,先嫁接再进行有性杂交,其单果种子粒数明显增加,千粒质量一般达到 0.08 g;而对于非嫁接直接授粉的方法,其单果种子饱满度较差,全为秕子。说明该方法有利于供体与受体基因间的渐渗和交流,能够明显提高外源 DNA 导入烟草的成功率,增加后代蒴果中的种子数量及千粒质量,如果结合回交,则能更显著地提高外源 DNA 导入的成功率(表 1)。

### 2.2 授粉环境对紫苏 DNA 导入烟草的影响

结果表明,在早晨或傍晚温度较低(22~25

℃)、相对湿度较大 (70 % ~ 80 %) 的环境条件下, 紫苏 DNA 导入烟草的成功率较高 (表 2)。可

见, 选择低温、高相对湿度的环境进行人工授粉是紫苏 DNA 成功导入烟草的重要条件之一。

表 1 嫁接后有性杂交对紫苏 DNA 导入烟草的影响

Table 1 Effect of sexual hybridization combined with asexual graft on introducing exogenous DNA into tobacco

材料	杂交花数	成果数	成功率/%	单果种子数	千粒质量/g
78-04	-	-	-	1976	0.0801
紫苏	-	-	-	4	3.805 0
林烟草 + 78-04	-	-	-	198 9	0.085 9
78-04 × 紫苏	89	9	0	秕子	0
(林烟草 + 78-04) × 紫苏	183	62	33.88	188	0.076 0
(林烟草 + 78-04) × 紫苏 BC <sub>1</sub>	87	81	93.10	327	0.080 1

表 2 不同温度、相对湿度对紫苏 DNA 导入烟草的影响<sup>1)</sup>

Table 2 Effect of different temperature and humidity on introducing exogenous DNA into tobacco

室温/℃	相对湿度/%	杂交花数	成果数	成功率/%
15~18	70~80	32	7	21.88
22~25	70~80	35	16	45.71
30~33	70~80	35	4	11.43
22~25	60~70	27	3	11.11
22~25	70~80	28	11	39.29
22~25	80~90	30	4	13.33

1) 材料为 (林烟草 + 78-04) × 紫苏

### 2.3 紫苏 DNA 导入对烟叶中芦丁含量的影响

叶片分析结果显示 (表 3), 在导入后代稳定品系紫苏烟中芦丁的含量比受体普通烟草品种 78-04 提高了 70.4 %; 并且比我国主要产区槐米的芦丁含量 (0.278 ~ 0.365 mg/g) 高 4 ~ 5 倍<sup>[4]</sup>。

表 3 紫苏烟叶中芦丁含量的测定

Table 3 Analytical result of Rutin in Zisu tobacco leaves

样品/mg	紫苏烟	78-04	紫苏
芦丁 Rutin <sup>1)</sup>	148.25	87	0.525

1) 以 100 g 烟叶计

## 3 讨 论

我国药用植物资源丰富, 国内已有利用外源药用植物基因导入异科植物方面的研究, 但迄今获得成功的报道仅有几例: 通过复态导入法将水稻 *Oryza sativa ssp. japonica* 品种通育 211 与柳叶菜科植物月见草 *Oenothera biennis* L. 进行远缘杂交, 获得了具有育种价值的水稻新种质<sup>[5]</sup>; 或采用原生质体

融合法获得了葡萄 *Vitis vinifera* L. 与伞形科植物狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonerifolium* Willd 的再生杂种植株<sup>[6]</sup>; 或利用无性嫁接和有性杂交相结合的创新育种方法分别将普通烟草 *Nicotiana tabacum* L. 品种与唇形科植物罗勒 *Ocimum basilicum* L. 或紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 远缘杂交, 选育出了具有较高工业利用价值的新型烟草稳定品系<sup>[7-8]</sup>。远缘杂交的最终目的是导入外源基因并能正确表达。由于常规有性杂交育种难以克服远缘植物间的不亲和性, 多采用基因操作的方法转移异源的有益基因。而采取先嫁接再有性杂交的方法, 能够促使药用植物与普通烟草基因间的渐渗、交流以及重组。经同工酶谱及分子鉴定, 后代中含有药用植物的外源基因<sup>[8]</sup>。可见, 这是提高导入外源基因成功率的有效方法之一, 也为开发利用药用植物基因资源提供了一条新的途径。

芦丁是由已糖或戊糖与多酚鞣皮素组成的黄酮类化合物, 具有多方面的生物活性, 主要存在于豆科植物槐 *Sophora japonica* L. 的花蕾 (槐花米)、果实 (槐角) 中, 也是烟草中含量较高的酚类物质之一, 对烟草及其制品的品质具有重要影响, 其含量因烟草类型和品种而不同。但是由于槐米资源不足, 目前我国芦丁的生产还不能充分满足市场需求。以紫苏为供体、普通烟草为受体的杂种后代, 可以大幅度提高烟叶中芦丁的含量, 这为提取宝贵的芦丁原料提供了新的来源。研究表明, 植物体内次生代谢物质的合成是受细胞内部相关基因调控的一系列复杂的生化反应过程。芦丁是一种黄酮类次生代谢产物, 是否由于转入的紫苏 DNA 导致烟草与紫苏基因互作, 进而对次生代谢物的合成途径进行了调控, 这些深层次的机制问题还有待于深入研究。

(下转第 111 页)

- 14(3):242-251.
- [14] 汪相. 锆石形态的定量描述及其动力学分析[J]. 中国科学 D 辑, 1998, 28(3):232-238.
- [15] VAVRA G. A guide to quantitative morphology of accessory zircon[J]. Chem Geol, 1993, 93:15-28
- [16] CROFU F, HANCHAR J M, HOSKIN P W O, et al. Atlas of zircon textures[J]. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 2003, 53:469-495
- [17] 丘志力, 龚盛玮, 于庆媛, 等. 福建明溪锆石巨晶中的斜锆石、锆石矿物包裹体及其成因启示[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2004, 43(6):135-139.
- [18] 银剑钊. 初论金刚石原生矿床成矿系列[J]. 地球科学-中国地质大学学报, 2000, 25(4):380-383.
- [19] 钟玉芳, 马昌前. 含 U 副矿物的地质年代学研究综述[J]. 地球科学进展, 2006, 21(4):372-382.
- [20] TAYLOR S R, McLENNAN S M. The continental crust: Its composition and evolution [M]. USA: Blackwell Scientific Publications, 1985
- [21] LI S, XIAO Y, LIU D, et al. Collision of the north China and Yangtse blocks and formation of coesite-bearing eclogites: Timing and processes[J]. Chem Geol, 1993, 109:89-111.
- [22] 赖冬梅. 锆石 U-Pb 年龄不一致原因浅析[J]. 四川有色金属, 2004, (2):12-18.
- [23] 湖南省 413 地质队. 湖南金刚石原生矿预测研究报告[R], 1990.
- [24] 舒良树, 周新民, 邓平, 等. 中国东南部中生代盆地特征与构造演化[J]. 地质通报, 2004, 23(9-10):876-884.
- [25] LI X H, McCULLOCH M T. Geochemical characteristics of Cretaceous mafic dikes from northern Guangdong, SE China: Age, origin and tectonic significance[J]. Geodynamics, 1998, 27:405-419
- [26] 谢桂青, 毛景文; 胡瑞忠, 等. 中国东南部中-新生代地球动力学背景若干问题的探讨[J]. 地质论评, 2005, 51(6):613-619
- [27] 范蔚茗, 王岳军, 郭峰, 等. 湘赣地区中生代镁铁质岩浆作用与岩石圈伸展[J]. 地学前缘, 2003, 10(3):159-169.

(上接第 104 页)

#### 参考文献:

- [1] 黄汉昌, 张艾, 姜招峰. 槐米中芦丁的提取及其与人血清蛋白荧光光谱研究[J]. 北京联合大学学报: 自然科学版, 2008, 22(4):11-14.
- [2] 杨虹琦, 周冀衡, 邵岩, 等. 不同产地烤烟叶中绿原酸和芸香苷的含量分析[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(4):670-673.
- [3] 李力, 杨涓, 戴亚, 等. 烤烟中绿原酸、萜萜亭和芸香苷的分布研究[J]. 中国烟草学报, 2008, 14(4):13-17.
- [4] 李培凡, 张韵慧, 肖莉, 等. RP-HPLC 法测定不同产地槐米中芦丁[J]. 中草药, 2006, 37(9):1419-1420.
- [5] 初秀成, 赵基洪, 柴杨, 等. 水稻与异科植物月见草远缘杂交[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(2):320-325.
- [6] 宋锡全, 夏光敏, 周爱芬, 等. 葡萄与柴胡科间体细胞杂交再生杂种植株[J]. 科学通报, 1999, 44(17):1832-1836.
- [7] 魏克强, 杨俊仙, 魏治中. 新型烟草化学成分及医药成分的初步分析[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(4):652-656.
- [8] 魏治中, 魏克强. 烟草远缘杂交育种[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008:53-58.